



妊娠子宮の生物時計は安定して機能している

著者	秋山 志津子
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/51126

妊娠子宮の生物時計は安定して機能している

秋山 志津子

1. 要約

妊娠期間中、母体における概日リズムの情報は、胎児生理や胎児の発達に対し重要な役割を担うことが分かっている。母体から胎児へ概日リズムを伝達する信号として、これまでホルモンや食餌が主に研究されてきた。しかしながら、妊娠子宮が概日リズムを有し、かつそのリズム信号を胎児へ伝達する機能を持っているのか否かについては、まだ十分に研究されていない。妊娠子宮の生物時計としての機能の有無を検討するため、我々は妊娠ラットの子宮と胎盤を用いて研究を行った。我々は、重要な時計遺伝子である *Period1* 遺伝子にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ *Per1-luc* (*Period1-luciferase* ; *Period1* ルシフェラーゼ) ラットを用い、非妊娠時、胎生 12 日、胎生 22 日（妊娠末期）における子宮の生物時計としての機能について、明暗環境と恒暗環境下で検討した。さらに、*in situ hybridization* にて、胎生 12 日、胎生 22 日における胎盤および脱落膜の *Per1* mRNA の発現パターンについても確認した。*in vitro* では、非妊娠時、妊娠期間中とも、明暗環境下で、子宮の *Per1-luc* の発現に消灯時間付近をピークとする明確な概日リズムを認めた。恒暗環境下においても、同様に *Per1-luc* の発現に概日リズムが観察された。脱落膜においては、明暗環境下で、*Per1* mRNA の発現は消灯後 6 時間の夜間にピークのある概日リズムを示し、恒暗環境下では、胎生 22 日にのみ同様に *Per1* mRNA の発現に概日リズムが観察された。一方、胎盤の迷路部においては、明暗環境下、恒暗環境下ともに *Per1* mRNA の発現に概日リズムは観察されなかった。以上の結果から、胎児に概日リズムの情報を伝達

する機能は、胎盤の胎児側組織である迷路部にはないものの、子宮と脱着膜には存在する可能性が示唆された。

2. 研究背景

地球上の多くの生物が、活動、睡眠、代謝、体温などの行動や生理学的機能において、約 24 時間周期の規則的な概日リズム (circadian rhythm; "circa-"はおよそ, "dian" は 1 日を意味する) を示す。これは、「時計遺伝子」と呼ばれる複数の遺伝子で構築された内因性の「生物時計」が生物に存在するためである。生物は、内因性の生物時計を外部環境に合わせることで環境の変化に対応している。哺乳類では、多くの臓器に生物時計が存在することが分かっており、個々の臓器に存在する生物時計が階層的に組織されている。その中でも、視床下部に存在する視交叉上核が階層の頂点として主導的な役割を果たし、網膜からの光刺激を利用して概日リズムの周期を同調させ、神経伝達やホルモンにより、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、子宮などの末梢臓器にある生物時計を統合していると考えられている^{1), 2), 3)}。妊娠中、子宮内の胎児にも生物時計が存在することが分かっており、胎児自身の生物時計を子宮外環境に合わせるために、胎盤を介したホルモンや栄養による母体からの信号を利用している^{4), 5)}。

近年、生物時計の概日リズムの発振機構に関して遺伝子レベルで明らかになりつつある。時計遺伝子産物は転写調節因子として機能し、BMAL1-CLOCK 蛋白が結合した 2 量体が Period (Per) や Cryptochrome (Cry) 遺伝子の発現を促進し、PER や

CRY 蛋白が自身の遺伝子の転写を抑制するといった、時計遺伝子の転写・翻訳のフィードバックに基づく自己調節機構により、臓器の生物時計が調節されている¹⁾。

3. 研究目的

子宮内環境は、概日リズムにて制御されていると考えられる。その概日リズムは、母体のホルモンや摂食による栄養素の日内変動、それら因子の胎盤通過性に存在する日内変動、そして子宮自身の動きに存在する日内変動によって構成された非光学的刺激に依存する^{4), 5)}。哺乳類では、母体のメラトニンの血中濃度が概日パターンとなり、胎児に外部の明暗サイクルの情報を伝達し、それにより胎児の生物時計を 24 時間周期に合わせることが出来ると考えられている^{4), 6), 7)}。胎児の生物時計はまた、妊娠中の母親の摂食スケジュールの影響をうけることも報告されている^{5), 8)}。しかしながら、妊娠子宮と胎盤の概日リズムの有無については、それらの臓器の及ぼす胎児生理への影響を理解することが重要であるにも関わらず、十分に研究されていない。

そこで、我々は子宮内環境が胎児の概日リズムに与える作用機構について知見を得るため、Period1 プロモーター部分にルシフェラーゼ (luciferase; luc) 遺伝子を結合したマウスの Period1 (Per1) 遺伝子を組み込んだ遺伝子操作ラットを用い⁹⁾、重要な時計遺伝子のひとつである Per1 遺伝子の発現を検討した。in vitro で、この遺伝子操作動物の子宮と胎盤組織から放出される生物発光を記録し、組織の概日リズムを継続して観察した。さらに in situ hybridization により、我々は特に脱落膜と胎盤迷

路部の生物時計についても検討を行った.

4. 研究方法

I 動物と育成

この研究のため, ホタルのルシフェラーゼ遺伝子を 6.7kb の Period1 遺伝子のプロモーター部分につなげ, それを組み込んだ遺伝子操作 Per1-luc ラット (Japanese Wistar) のホモを交配し, ホモの胎仔を妊娠させた. これらの動物の繁殖の詳細や方法についてはすでに発表されている^{9), 10)}. 子宮と胎盤組織の Per1-luc の測定のため, 期間内に妊娠した Per1-luc ラット (n = 5) を 12 : 12 時間の明暗環境 (8 時に点灯し 20 時に消灯 ; 明期のケージ内の照度は 200 lux) もしくは恒暗環境下で個別のケージにて飼育し, 餌は制約なく与えた. ラットの行動量は, オンラインシステム (Actograph System, Rapid Fire Computer, Japan) を用い, 赤外線モーションセンサーにて記録した. 胎盤の in situ hybridization のため, Per1-luc ラット作製に使用した野生型のウィスターラット (Japanese Wistar) (明暗環境下に n = 20 ; 恒暗環境下に n = 20) も同様に用意した. 動物の飼育や扱いに関しては, 東北大学動物実験専門委員会にて検討され承認されている.

II 子宮, 胎盤そして母体の視交叉上核における Per1-luc の概日リズムと位相の評価

明期と暗期が 12 : 12 時間の明暗環境下における動物の概日行動リズムの有無につ

いて活動評価をするため、発情間期における子宮組織での Per1-luc の発現を記録する目的で非妊娠 Per1-luc ラット (n = 5) を用いた。我々は Zeitgeber Time (ZT) 11, すなわち消灯の 1 時間前 (点灯の時間は ZT0, 消灯の時間は ZT12 とする) に非妊娠 ラットを解剖し、速やかに子宮と視交叉上核を摘出した。さらに、妊娠 Per1-luc ラットも子宮、胎盤、そして視交叉上核における Per1-luc の発現を記録する目的で、非妊娠 Per1-luc ラットと同じ方法で胎生 12 日 (n = 5) 及び胎生 22 日、すなわち予定日前日 (n = 5) に解剖した。我々は、妊娠 Per1-luc ラットを ZT11 に解剖し、速やかに子宮、胎盤、そして視交叉上核を摘出した。ZT11 から ZT11.5 の間に、子宮角の子宮組織 (厚さ 1 mm)、胎盤の脱落膜と迷路部の組織 (厚さ 1 mm)、そしてそれぞれの Per1-luc ラットの脳から視交叉上核の組織切片 (vibroslicer による厚さ 300 μ m の冠状断切片) を、10 mM の HEPES (Sigma), 2% B27, 25 U/mL のペニシリン, 25 μ g/mL のストレプトマイシン, 2.2 mg/mL の NaHCO₃, 4mM の L-glutamine, そして 0.1mM の beetle luciferin (Promega, Madison, WI) が添加された 1 mL の培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium, Sigma, St.Louis, MO) の中に、組織培養のため人工膜 (Millicell-CM, Millipore, Bedford, MA) 上に配置した。記載されているものを除いては、培養材料は Invitrogen (Carlsbad, CA) から購入した。それぞれの培養は、ペトリ皿の中に密閉され、暗闇の中で 36°C に維持された。生物発光は、培養交換せず、4.5 日間にわたり光電子増倍管 (HC8259MOD, Hamamatsu Corp., Shizuoka, Japan) を用いて一分毎に計測された。

子宮内の生物時計への明暗環境の影響，特に光の影響を直接受け、胎盤透過性をもつメラトニン分泌等の生理機能の影響を除外するため，もう 1 組の非妊娠 ($n = 5$)，妊娠 (胎生 12 日，胎生 22 日各々に $n = 5$) Per1-luc ラットを恒暗環境にて飼育した．光環境の影響を評価するためのプロトコールとしては，恒暗条件 2 日間が標準的であり，暴露期間として十分であることから，恒暗環境下においた 2 日目，ラットの視覚感知閾値外の赤色光下で ($< 0.1 \text{ lux}$)，これらのラットを Circadian time (CT) 11 (CT0 と CT12 は，それぞれ恒暗環境下での活動の開始，終了時間とした；CT0 と CT12 は明暗環境下における点灯と消灯の時間にほぼ一致する) に断頭した．その後，明暗環境下での妊娠 Per1-luc ラットと同様の方法で，各々の臓器や視交叉上核の組織培養が作成された．

各々の培養組織から放出された光子の数は，前述のように⁹⁾，exmax software (gift from Mr. Tsuyoshi Yaita and Dr. Shigenobu Shibata, Waseda University, Tokyo, Japan) を用いて変換し，連続した 2 時間の平均でトレンド除去を行った^{5), 11), 12)}．Per1-luc 活性の周期 (in vitro で 12 から 48 時間まで記録) は，前述のように^{9), 13)}，個々の視交叉上核の培養組織で評価され，1 番目と 2 番目のピークの間の周期と 2 番目と 3 番目のピークの間の周期を平均することにより算出した．子宮と視交叉上核の培養組織の Per1-luc の振幅は，生物発光のトレンド除去した曲線の 1 番目の谷と 2 番目の頂点の間の差を計測した．統計学的比較は one-way ANOVA ($p < 0.05$) にて行った．

III 脱落膜及び胎盤における Per1 mRNA の発現の評価

胎生 12 日と胎生 22 日において、野生型ウィスターラットを明暗環境下の 4 つの時刻で断頭した： ZT0, ZT6, ZT12, そして ZT18 (各々の時刻において $n = 5$)。明暗環境の影響を取り除くため、もう 1 組の妊娠した野生型ウィスターラットを恒暗環境下へ移動させ、恒暗環境での 2 日目に、同様に 4 つの時間で断頭した： CT0, CT6, CT12, そして CT18。恒暗環境下では、断頭はラットの視覚感知閾値外の赤色光下 ($< 0.1 \text{ lux}$) で行われた。脱落膜及び胎盤は速やかに摘出し、ドライアイスの中で冷凍した。組織は、in situ hybridization のために切り出すまで、 -80°C で保存した。本研究では胎盤組織において部位特異的に mRNA の発現量の検討を行う必要があり、mRNA の破壊を最小限に防ぐ目的で凍結切片を使用した。

in situ hybridization にて、胎盤における Per1 mRNA の発現レベルを測定した。胎盤組織は、クリオスタット (HM505E, Microm, Germany) にて、薄切片 (厚さ $40 \mu\text{m}$) として切り出した。[RI: a[33P]UTP (New England Nuclear, USA)] によるアンチセンス・センス鎖の相補的 RNA の放射性同位元素による標識と、in situ hybridization の手順については、すでに報告されている方法に従った^{14), 15)}。標識されたアンチセンス・センス鎖の相補的 RNA プロブは、京都大学の岡村先生から寄贈された制限酵素、直鎖状相補的 DNA 鋳型から作製した。BioMax MR film (Kodak) 上の各々の切片の放射能は、 ^{14}C -autoradiographic microscaler (Pharmacia Biotech,

Buckinghamshire, UK)により光学密度に変換してから,画像解析システム(MCID, Imaging Research Inc., Canada)にて解析を行った.胎盤組織の光学密度の値は,1つの胎盤につき4切片サンプリングした組織の明暗度の平均として算出した.胎盤における Per1 mRNA の発現の概日リズムを検出するため,one-way ANOVA を用いた ($p < 0.05$).

5. 研究結果

I 妊娠ラットの子宮における Per1 遺伝子発現の概日リズム

赤外線センサーによる行動評価により,妊娠している Per1-luc ラットの行動に通常の概日リズムが確認された.すなわち明暗環境下では暗期により活動的になり,恒暗環境下でも明暗環境での暗期に相当する時間帯により活動的になることが確認された(データは掲示されていない).

明暗環境下においては,非妊時と妊娠中のどちらも,Per1-luc の計測で,子宮の Per1 遺伝子発現は概日リズムを示した.これまで報告と同様に,非妊娠の子宮における Per1-luc 発現には概日リズムが認められた(周期: 24.1 ± 0.8 時間, mean \pm S.D., 以下同じ; 振幅: $16,663 \pm 4,262$ photons / min; 図 1A, 表 1) (Hastings et al. 2003; Dolatshad et al. 2006; Maywood et al. 2007). 妊娠中期の胎生 12 日にも,明らかな Per1-luc 発現の概日リズムが観察された(周期: 24.1 ± 0.5 時間; 振幅: $29,686 \pm 14,961$ photons / min; 図 1B, 表 1). 妊娠末期,すなわち予定日前日の

胎生 22 日でも同様に Per1-luc 発現の概日リズムが観察された(周期: 25.1 ± 0.7 時間; 振幅: $19,722 \pm 10,786$ photons / min; 図 1C, 表 1). 非妊娠のラットでは, 子宮の概日リズムのピークは母体の視交叉上核のピークの約 3 時間後であった. 子宮と母体の視交叉上核との Per1-luc 発現リズムの位相関係は, 妊娠ラットでも同様であった (one-way ANOVA, $p > 0.05$, 表 1).

恒暗環境でも, 同様の結果が得られた: 非妊娠の子宮組織 (周期: 24.7 ± 1.1 時間; 振幅: $19,013 \pm 11,303$ photons / min; 図 2A, 表 1), 胎生 12 日の子宮組織 (周期: 24.0 ± 1.0 時間; 振幅: $12,934 \pm 7,538$ photons / min; 図 2B, 表 1), 胎生 22 日の子宮組織 (周期: 24.2 ± 0.7 時間; 振幅: $12,332 \pm 9,063$ photons / min; 図 2C, 表 1). 明暗・恒暗環境の両方で, 子宮のピークの位相は母体の視交叉上核のそれと比較して約 3 時間遅れていた. 非妊娠 Per1-luc ラット, 妊娠した Per1-luc ラットのどちらにおいても, 子宮と母体の視交叉上核の間の位相差に変化はなかった (one-way ANOVA, $p > 0.05$, 表 1). また, 明暗環境下, 恒暗環境下ともに, 自律振動する培養子宮組織の周期と振幅は, 妊娠期の影響を受けなかった (one-way ANOVA, $p > 0.05$, 表 1).

II 妊娠ラットの胎盤迷路部と脱落膜における Per1 遺伝子発現の概日リズム

我々は, 明暗環境下の胎生 22 日の妊娠ラットを用い, 胎盤迷路部のトロホブラストと脱落膜について検討した. 脱落膜と胎盤の全ての組織で, Per1-luc の発現レベルは高かったが, 迷路部のトロホブラストは概日リズムを示さなかった. 一方, 脱落膜

細胞層は、in vitro で 1 から 2 回周期のリズムを示した後、減衰する概日振動を示した (図 3A, B).

培養組織において概日振動の振幅が漸減する原因としては、進行性の細胞死、個々の細胞間における生物時計の非同調、あるいは同時進行性の細胞におけるリズムの減衰といった、細胞培養に関連した因子が挙げられる。これらのなかで、細胞死の可能性については、一旦 Per1-luc 遺伝子発現のリズムを失った迷路部のトロホブラストや脱落膜を含む培養組織において、CREB を介した Per1 遺伝子のプロモーター刺激物質であるフォルスコリンの添加により、再度一過性に Per1-luc 遺伝子発現を増加させたことから否定できる (データは揭示されていない)。

さらに我々は、明暗環境下、恒暗環境下での胎生 12 日と胎生 22 日の脱落膜及び胎盤における Per1 mRNA の発現について、in situ hybridization によって評価した。明暗環境下、恒暗環境下ともに、妊娠中の迷路部においては、明らかな概日リズムは観察されなかった (one-way ANOVA, $p > 0.05$, 図 4-7)。それに対し、明暗環境下で、脱落膜において、Per1 mRNA 発現の概日リズムが胎生 12 日、胎生 22 日ともに検出された (one-way ANOVA, $p < 0.05$, 図 4-7)。しかしながら、恒暗環境下において、胎生 12 日には、脱落膜においてさえも、概日リズムは指摘されなかった (one-way ANOVA, $p > 0.05$, 図 6)。

III 妊娠中の母体視交叉上核における Per1 遺伝子発現の概日リズム

明暗環境下（図 8）、恒暗環境下（図 9）において、非妊娠、妊娠ラットともに母体視交叉上核における *Per1-luc* 遺伝子発現の概日リズムが示された。明暗環境下、恒暗環境下どちらにおいても、非妊娠と妊娠ラットとの間には、視交叉上核の *Per1-luc* 遺伝子発現の概日リズムに変化はなかった（表 1; one-way ANOVA, $p > 0.05$ ）。

6. 考察

以上の結果から、妊娠母体の生物時計について 2 つの重要な点が推測される。1 つ目は、妊娠全期間を通して、妊娠母ラットの視交叉上核及び子宮の生物時計の概日リズムは、明暗環境下でも恒暗環境下でも非妊時と同様に維持され、妊娠の影響を受けないことが明らかになった。妊娠中、子宮筋層には、着床後のプロゲステロン・エストロゲン等の性ホルモンに反応して、増殖や脱落膜化などの大規模な組織再構成（リモデリング）が起こる¹⁶⁾。子宮は、プロゲステロンとエストロゲンに対するレセプターを有し、また *in vitro* においてはプロゲステロン（P4）とエストロゲンに属するエストラジオール（E2）の投与後のラットの子宮で実際に *Per1* 遺伝子の発現が増えることがこれまでに報告されている¹⁸⁾。しかしながら、妊娠中のプロゲステロンの長期にわたる増加や分娩直前のエストロゲンの一過性の増加にも関わらず¹⁶⁾、子宮は妊娠中安定した *Per1-luc* の発現の概日リズムを維持した。このことは、母体の脳時計「視交叉上核」においても同様である。視交叉上核における *Per2* 発現の概日リズムは恒暗環境下において E2 投与による影響を受けると報告されているが¹⁹⁾、今回の研究で

は、視交叉上核の *Per1-luc* 発現の概日リズムは妊娠による影響を受けておらず、妊娠中の血中プロゲステロンやエストロゲンの増加は、子宮と母体「視交叉上核」のどちらの生物時計においても、影響しない可能性を示している。おそらく、一定した明暗環境下では、妊娠による性ホルモンの増加の影響は、視交叉上核において光環境依存性にリセットされ、打ち消されると考えられる。加えて、明暗環境においても恒暗環境においても、妊娠していないラットでは、子宮の概日リズムのピークは視交叉上核の約 3 時間後であり、子宮のような末梢組織は、安定した、視交叉上核とは異なる概日リズムの位相を持つことを示している。子宮と母体視交叉上核との位相の関係は、妊娠ラットでも同様であった（表 1）。

2 つ目は、子宮は安定した概日リズムを示すのに対し、脱落膜及び胎盤は安定した *Per1-luc* の発現リズムを示さなかった。今回の研究では、胎児側の組織として胎盤迷路部、母体側の組織として脱落膜の *Per1-luc* の発現を調べた。胎盤迷路部では、*Per1-luc* の発現に概日リズムは観察されなかった。脱落膜では *Per1-luc* の発現に持続した概日リズムは観察されず、1 から 2 サイクルの概日リズムを示した後、消失した。この結果は、*in vitro* で酢酸メドロキシプロゲステロンと N6,2-O-ジブチリル cAMP (cyclic AMP) により脱落膜化を誘発した後の子宮の間質細胞にて、*Per2-luc* 発現に 1 度だけピークを認め、持続した概日リズムを認めなかったとの実験結果²⁰⁾により部分的に支持される。我々は、*in situ hybridization* により、脱落膜及び胎盤の *Per1* mRNA 発現についてさらに調査を行った。胎盤迷路部では *Per1-luc* の結果

と同様にやはり明らかな概日リズムは観察されなかったが、脱落膜では *Per1* mRNA の発現に概日リズムを認めた。これらの結果から、母体側の子宮内膜組織由来の脱落膜は生物時計が存在するものの、胎盤の胎児側組織である迷路部には生物時計が存在しないことを示唆している。しかしながら、胎盤において *Mel 1a receptor* (メラトニン受容体) の発現に明確な概日リズムがあると報告されている²¹⁾。メラトニン投与は *Mel 1a receptor* mRNA の発現を誘発するものの、胎児の臓器では *Period2* などの時計遺伝子の mRNA の発現には影響せず²²⁾、母体からのメラトニン分泌の概日リズムは *Mel 1a receptor* の発現を誘導する原因となるものの、胎児側組織である迷路部の生物時計の同調には寄与しないと考えられる。また、胎児由来の組織である胎盤迷路部において、*Per1-luc* の発現及び *Per1* mRNA の発現に概日リズムが認められないという今回の結果は、精巣や胸線といった細胞分化が進行中の成人の組織においても、概日リズムが認められないというこれまでの報告と類似している¹⁷⁾。脱落膜に比べ、迷路部の *Per1* mRNA 発現レベルが同等あるいは相対的に多い点については、*in vivo* においても *Per1* mRNA 発現量を持続的に増加させるプロゲステロンが、妊娠中、長期的に高値になる現象によって説明できる¹⁸⁾。

7. 結論

これまでの研究から、子宮内の胎児は、胎児の生物時計を母体環境に適合させるため、母体からの信号を利用することが示唆されている^{5), 23), 24), 25), 26), 27), 28), 29), 30), 31)}。

これらの信号は、胎盤を通した母親からのホルモンや食餌などを含む様々な非光学的刺激や子宮の運動であると考えられている⁴⁾。今回の研究は、遺伝子レベルで妊娠子宮と脱落膜の安定した生物時計の存在を初めて証明することにより、さらにこの意見を支持するものである。我々の研究は、妊娠子宮と胎盤の概日リズムそして、胎児の生理学的機能との相互関係を解明する基礎となり、また発達過程にある生物が正常な生理機能を獲得するために概日リズムの環境が重要であることを示唆している^{5), 32), 33), 34), 35), 36), 37), 38)}。

8. 文献

1. Hastings MH, Reddy AB and Maywood ES: A clockwork web: circadian timing in brain and periphery, in health and disease. *Nat Rev Neurosci* 4: 649-661, 2003
2. Dolatshad H, Campbell EA, O'hara L, et al: Developmental and reproductive performance in circadian mutant mice. *Hum Reprod* 21: 68-79, 2006
3. Maywood ES, O'Neill JS, Chesham JE, et al: Minireview: The circadian clockwork of the suprachiasmatic nuclei – analysis of a cellular oscillator that drives endocrine rhythms. *Endocrinology* 148: 5624-5634, 2007
4. Serón-Ferré M, Valenzuela GJ, Torres-Farfan C: Circadian clocks during embryonic and fetal development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 81:

204-214, 2007

5. Ohta H, Xu S, Moriya T, et al: Maternal feeding controls fetal biological clock. PLoS One 3: e2601, 2008
6. Davis FC, Mannion J: Entrainment of hamster pup circadian rhythms by prenatal melatonin injections to the mother. Am J Physiol 255: R439-448, 1988
7. Illnerová H, Buresova M, Presl J: Melatonin rhythm in human milk. J Clin Endocrinol Metab 77: 838-841, 1993
8. Weaver DR, Reppert SM: Periodic feeding of SCN-lesioned pregnant rats entrains the fetal biological clock. Brain Res Dev Brain Res 46: 291-296, 1986
9. Yamazaki S, Numano R, Abe M, et al: Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. Science 288: 682-685, 2000
10. Hida A, Koike N, Hirose M, et al: The human and mouse Period1 genes: five well-conserved E-boxes additively contribute to the enhancement of mPer1transcription. Genomics 65: 224-233, 2000
11. Hayasaka N, Yaita T, Kuwaki T, et al: Optimization of dosing schedule of daily inhalant dexamethasone to minimize phase shifting of clock gene expression rhythm in the lungs of the asthma mouse model. Endocrinology 148: 3316-3326, 2007

12. Hirao A, Tahara Y, kimura I, et al: A balanced diet is necessary for proper entrainment signals of the mouse liver clock. PLoS One 4: e6909, 2009
13. Ohta H, Yamazaki S, McMahon DG: Constant light desynchronizes mammalian clock neurons. Nat Neurosci 8:267-269, 2005
14. Moriya T, Horikawa K, Akiyama M, et al: Correlative association between N-methyl-D-aspartate receptor-mediated expression of period genes in the suprachiasmatic nucleus and phase shifts in behavior with photic entrainment of clock in hamsters. Mol Pharmacol 58: 1554-1562, 2000
15. Shimomura H, Moriya T, Sudo M, et al: Differential daily expression of Per1 and Per2 mRNA in the suprachiasmatic nucleus of fetal and early postnatal mice. Eur J Neurosci 13: 687-693, 2002
16. Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H: Physiology of reproduction. ed Krinke GJ, In The Laboratory Rat, 1st ed, Academic Press, San Diego, PA, 2000; 145-176
17. Alvarez JD, Chen D, Storer E, et al: Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. Biol Reprod 69: 81-91,2003
18. He PJ, Hirata M, Yamauchi N, et al: Up-regulation of Per1 expression by estradiol and progesterone in the rat uterus. J Endocrinol 194: 511-519, 2007
19. Nakamura TJ, Moriya T, Inoue S, et al: Estrogen differentially regulates

- expression of Per1 and Per2 genes between central and peripheral clocks and between reproductive and nonreproductive tissues in female rats. *J Neurosci* 15: 1953-1960, 2005
20. He PJ, Hirata M, Yamauchi N, et al: The disruption of circadian clockwork in differentiating cells from rat reproductive tissues as identified by in vitro real-time monitoring system. *J Endocrinol* 193: 413-420, 2005
21. Lee CK, Moon DH, Shin CS, et al: Circadian expression of Mel 1a and PL- II genes in placenta: effects of melatonin on the PL- II gene expression in the rat placenta. *Mol Cell Endocrinol* 200: 57-66, 2003
22. Torres-Farfan C, Rocco V, Monsó C, et al: Maternal melatonin effects on clock gene expression in a nonhuman primate fetus. *Endocrinology* 147: 4618-4626, 2006
23. Reppert SM, Schwartz WJ: Maternal coordination of the fetal biological clock in utero. *Science* 220: 969-971, 1983
24. Davis FC, Gorski RA: Development of hamster circadian rhythms: role of the maternal suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol [A]* 162: 601-610, 1988
25. Parraguez VH, Valenzuela GJ, Vergana M, et al: Effect of constant light on fetal and maternal prolactin rhythms in sheep. *Endocrinology* 137: 2355-2361, 1996

26. Kennaway DJ: Programming of the fetal suprachiasmatic nucleus and subsequent adult rhythmicity. *Trends Endocrinol Metab* 13: 398-402, 2002
27. Ohta H, Honma S, Abe H, et al: Effects of nursing mothers on rPer1 and rPer2 circadian expressions in the neonatal rat suprachiasmatic nuclei vary with developmental stage. *Eur J Neurosci* 15: 1953-1960, 2002
28. Ohta H, Honma S, Abe H, et al: Periodic absence of nursing mothers phase-shifts circadian rhythms of clock genes in the suprachiasmatic nucleus of rat pups. *Eur J Neurosci* 17: 1628-1634, 2003
29. Sládek M, Sumová A, Kováčiková Z, et al: Insight into molecular core clock mechanism of embryonic and early postnatal rat suprachiasmatic nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 6231-6236, 2004
30. Li X, Davis FC: Developmental expression of clock genes in the Syrian hamster. *Brain Res Dev Brain Res* 158: 31-40, 2005
31. Saxena MT, Aton SJ, Hildebolt C, et al: Bioluminescence imaging of period1 gene expression in utero. *Mol Imaging* 6: 68-72, 2007
32. Mann NP, Haddow R, Stokes L, et al: Effect of night and day on preterm infants in a newborn nursery: randomized trial. *Br Med J (Clin Res Ed)* 293: 1265-1267, 1986
33. Miller CL, White R, Whitman TL, et al: The effects of cycled versus noncycled

- lighting on growth and development in preterm infants. *Infant Behav Dev* 18: 87-95, 1995
34. Mirmiran M, Ariagno RL: Influence of light in the NICU on the development of circadian rhythms in preterm infants. *Semin Perinatol* 24: 247-257, 2000
35. Brandon DH, Holditch-Davis D, Belyea M: Preterm infants born at less than 31 weeks' gestation have improved growth in cycled light compared with continuous near darkness. *J Pediatr* 140: 192-199, 2002
36. Rivkees SA, Mayes L, Jacobs H, et al: Rest-activity patterns of premature infants are regulated by cycled lighting. *Pediatrics* 113: 833-839, 2004
37. Miller BH, Olson SL, Turek FW, et al: Circadian clock mutation disrupts estrous cyclicity and maintenance of pregnancy. *Curr Biol* 14: 1367-1373, 2004
38. Ohta H, Mitchell AC, McMahon DG: Constant light disrupts the developing mouse biological clock. *Pediatr Res* 60: 304-308, 2006

謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始御懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野 教授 中畑 則道 先生，金沢大学理工研究域自然システム学系 教授 程 肇 先生，東北大学大学院医学系研究科小児病態学教授 土屋 滋 先生，東北大学国際高等研究教育機構国際高等融合領域研究所 教授 木村 芳孝 先生，東北大学大学院医学系研究科周産期医学婦人科学分野 名誉教授 岡村 州博 先生，東北大学大学院医学系研究科周産期医学婦人科学分野 教授 八重樫 伸生 先生に謹んで感謝の意を表します．

本論文をまとめるにあたり，終始御懇篤なる御指導，御助言を賜りました東北大学医学部附属病院周産母子センター 講師 太田 英伸 先生，同講師 千坂 秦 先生，同准教授 松田 直 先生，同特任助手 渡邊 真平 先生，東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野 准教授 守屋 孝洋 先生，東北大学大学院薬学研究科細胞情報薬学分野 針生 彩 先生に厚く御礼を申し上げます．

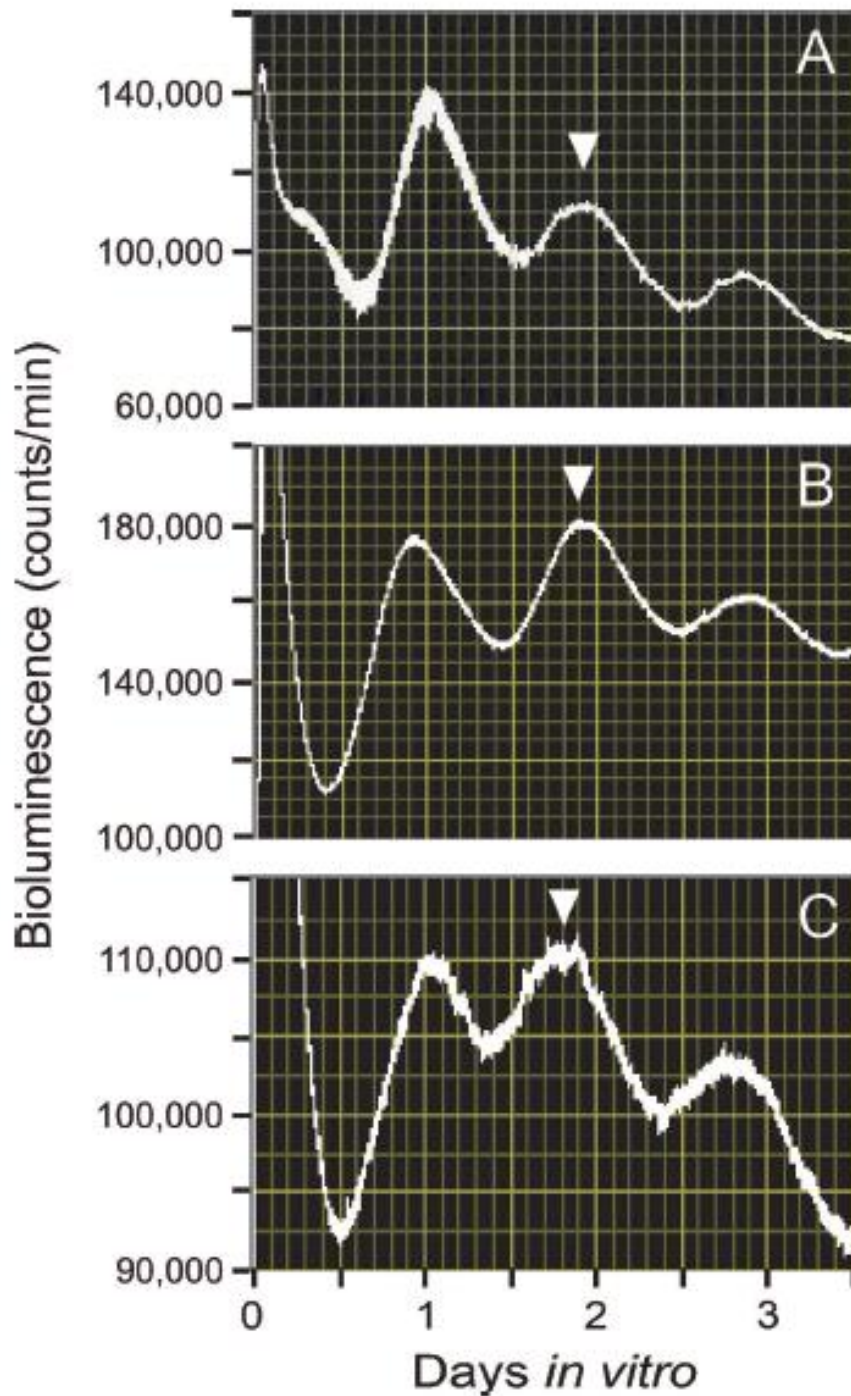


図 1. 明暗環境下における Per1-luc ラットから体外移植された子宮組織からの Per1-luc 発光リズム. 12:12 時間の明暗環境で、餌は制約なく与えた Per1-luc ラットの非妊娠時 (A), 胎生 12 日 (B), 胎生 22 日 (C) における子宮組織からの生データを示す. 先行研究^{9), 13)}より, *in vivo* における組織の位相は, *in vitro* における最初の日 (移植後 1 から 2.5 日) のピークの位相が最も良く反映すると考えられている. ピークの位相は各々の動物で一致している. ここでは, 統計上選んだピークを逆三角形で示している.

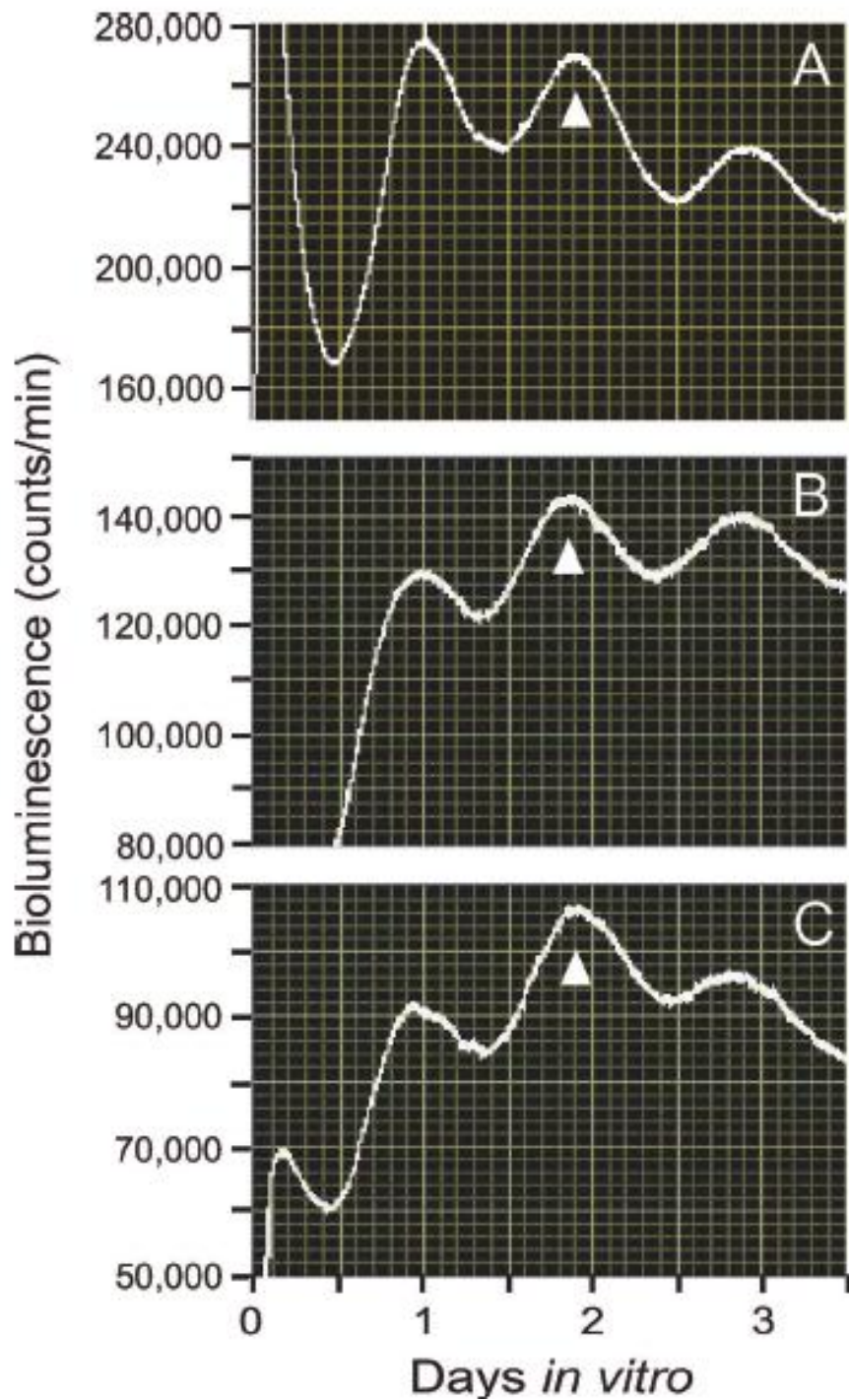


図 2. 恒暗環境下における Per1-luc ラットから体外移植された子宮組織からの Per1-luc 発光リズム. ラットは, 生物時計への光環境の影響を取り除くため, 移植に先立ち恒暗環境下に 2 日間おいた. 恒暗環境下で, 餌は制約なく与えた Per1-luc ラットの非妊娠時 (A), 胎生 12 日 (B), 胎生 22 日 (C) における子宮組織からの生データを示す. ここでは, 統計上選んだピークを逆三角形で示している. 詳細については, 図 1 の説明を参照.

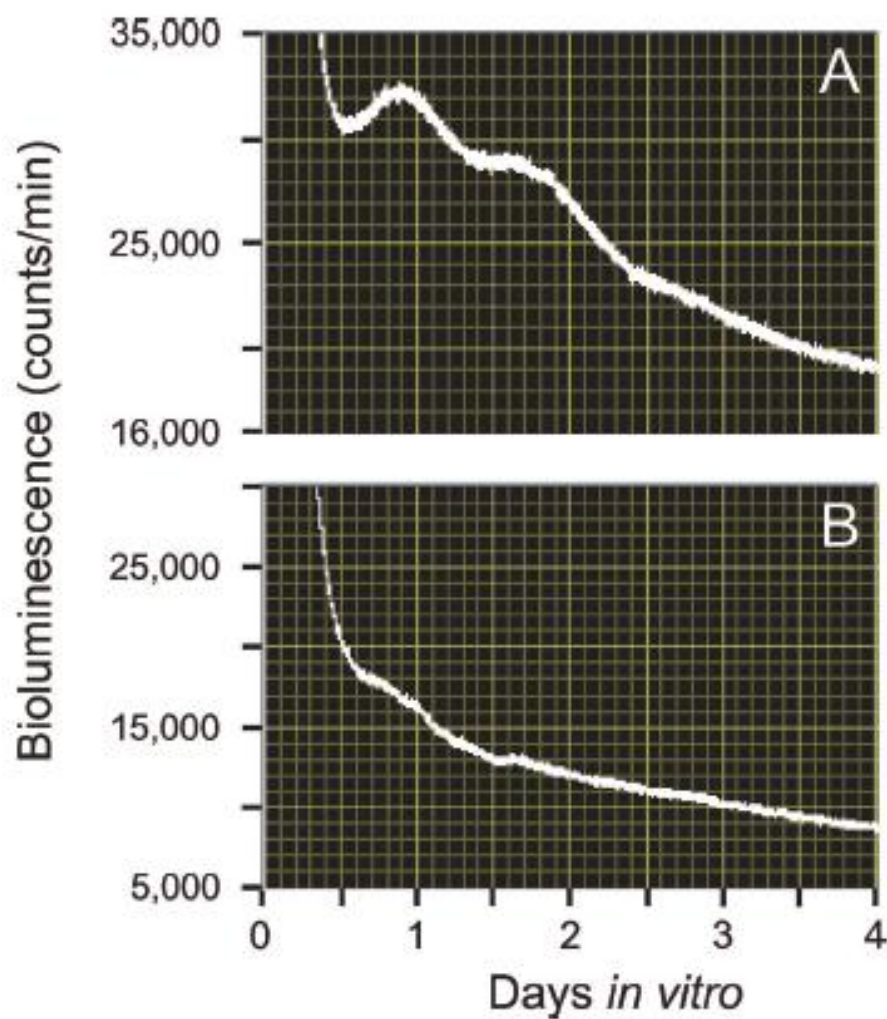


図 3. 明暗環境下における *Per1-luc* ラットから体外移植された脱落膜及び胎盤組織からの *Per1-luc* 発光リズム. 12 : 12 時間の明暗環境で、餌は制約なく与えた *Per1-luc* ラットの胎生 22 日における脱落膜及び胎盤組織からの生データを示す. 脱落膜 (A) は、*in vitro* において *Per1-luc* の発現が 1 から 2 サイクルの減衰する概日リズムを示した後、生物発光が漸減している. 一方迷路部 (B) は明らかな概日リズムは観察されない. 詳細については、図 1 の説明を参照.

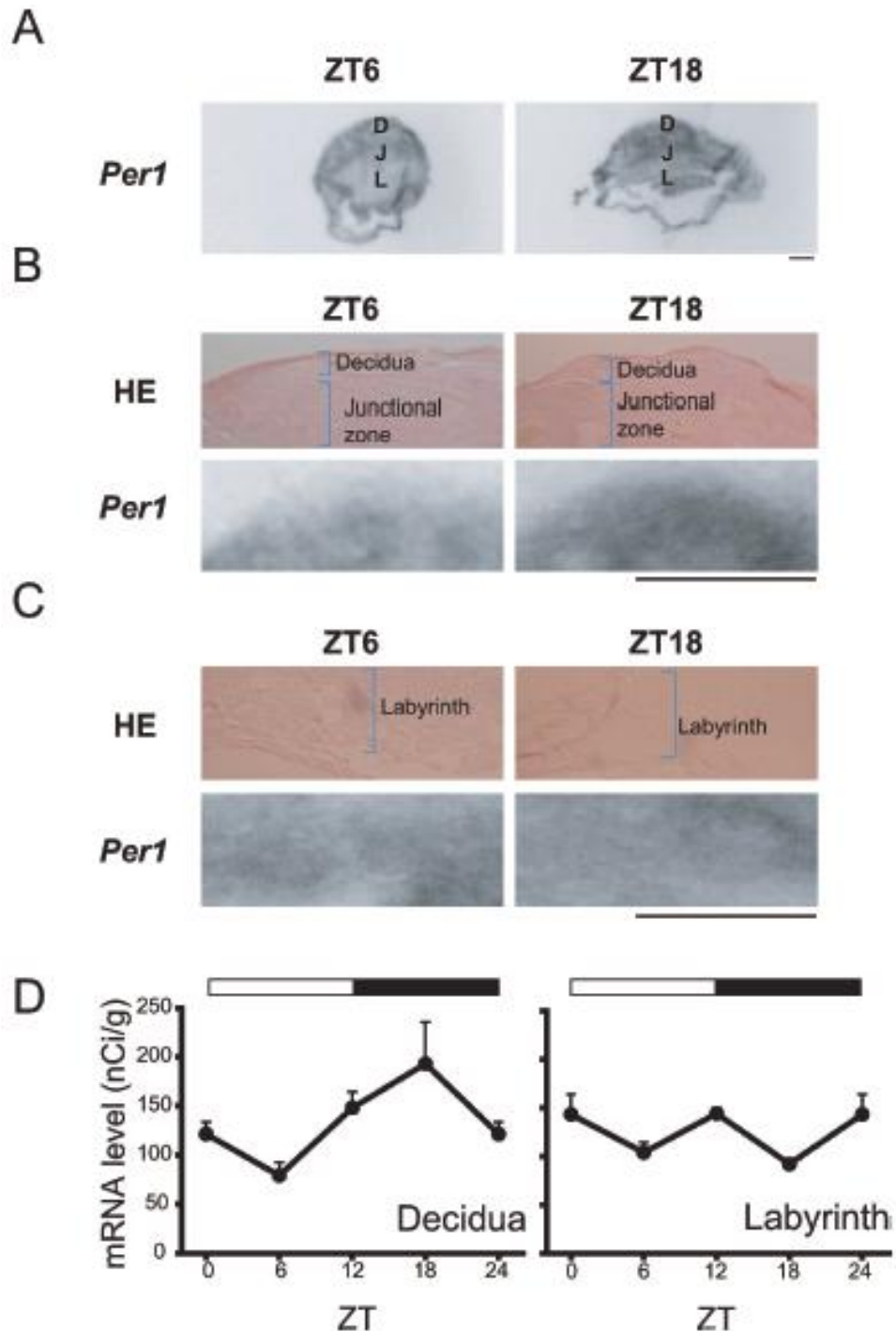


図 4. 明暗環境下における胎生 12 日の野生型母ラットから取り出した脱落膜及び胎盤の *Per1* 遺伝子の mRNA の発現. (A) 提示されている in situ hybridization のフィルム画像は、胎生 12 日の Zeitgeber time (ZT) 6 と ZT18 における、脱落膜及び胎盤の *Per1* mRNA 発現の変化を示している. 点灯と消灯の時間はそれぞれ ZT0 と ZT12 とした. D, decidua; 脱落膜. J, junctional zone. L, labyrinth; 迷路部. The bar = 1mm. (B) in situ hybridization 後、HE 染色された脱落膜と junctional zone. The bar = 1mm. (C) in situ hybridization 後、HE 染色された迷路部. The bar = 1mm. (D) 脱落膜と迷路部における、*Per1* mRNA の発現量を 24 時間で示したグラフ (各々のサンプリング時間につき $n = 5$, mean \pm S.E.). グラフの上部にある白と黒の水平棒は、各々明期と暗期を表している. 迷路部では *Per1* mRNA の発現に概日リズムが観察されない (one-way ANOVA, $p > 0.05$) 一方で、脱落膜では *Per1* mRNA の発現に概日リズムを認める (one-way ANOVA, $p < 0.05$).

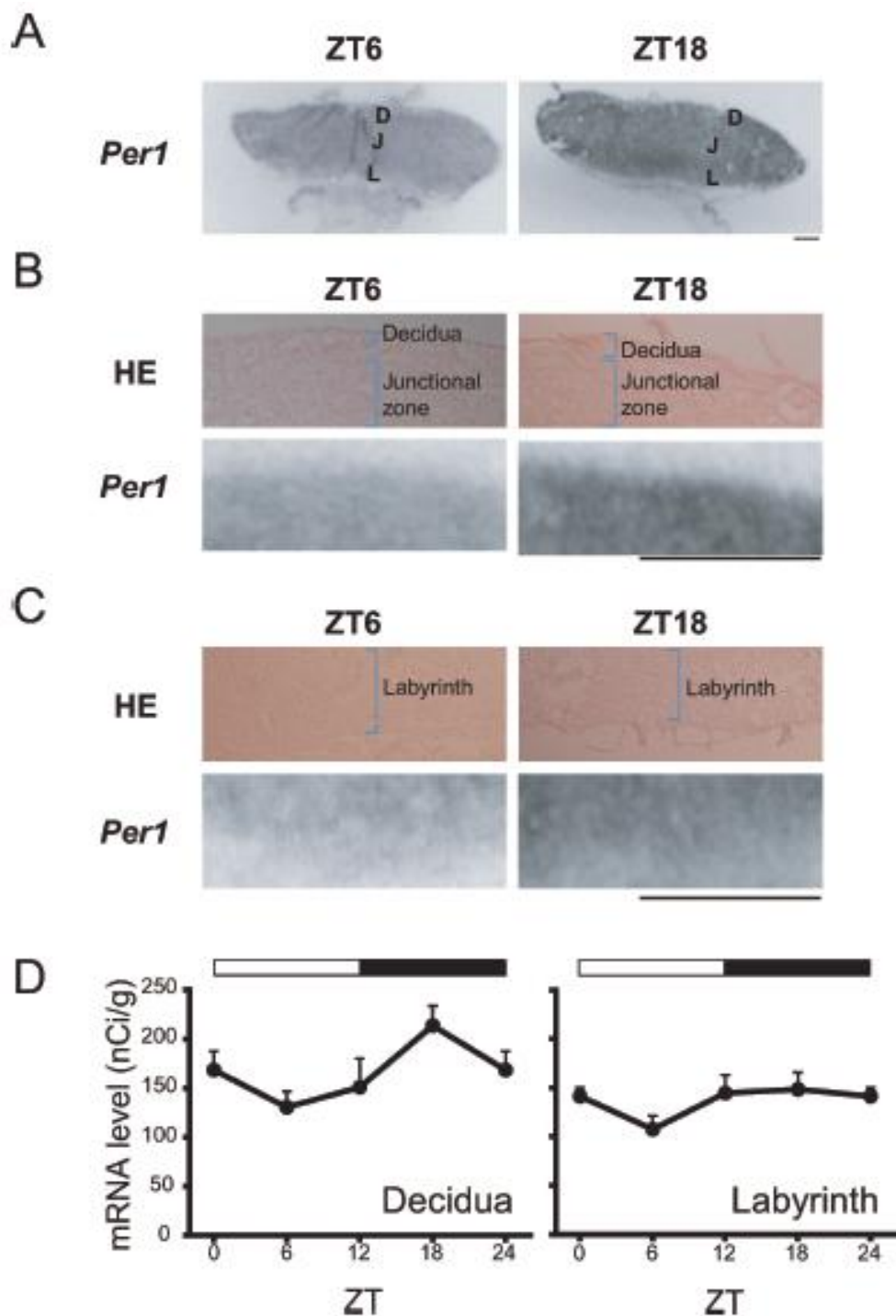


図 5. 明暗環境下における胎生 22 日の野生型母ラットから取り出した脱落膜及び胎盤の *Per1* 遺伝子の mRNA の発現. (A) 提示されている in situ hybridization のフィルム画像は、胎生 22 日の Zeitgeber time (ZT) 6 と ZT18 における、脱落膜及び胎盤の *Per1* mRNA 発現の変化を示している. D, decidua; 脱落膜. J, junctional zone. L, labyrinth; 迷路部. The bar = 1mm. (B) in situ hybridization 後、HE 染色された脱落膜と junctional zone. The bar = 1mm. (C) in situ hybridization 後、HE 染色された迷路部. The bar = 1mm. (D) 脱落膜と迷路部における、*Per1* mRNA の発現量を 24 時間で示したグラフ (各々のサンプリング時間につき $n = 5$, $\text{mean} \pm \text{S.E.}$). グラフの上部にある白と黒の水平棒は、各々明期と暗期を表している. 迷路部では *Per1* mRNA の発現に概日リズムが観察されない (one-way ANOVA, $p > 0.05$) 一方で、脱落膜では *Per1* mRNA の発現に概日リズムを認める (one-way ANOVA, $p < 0.05$).

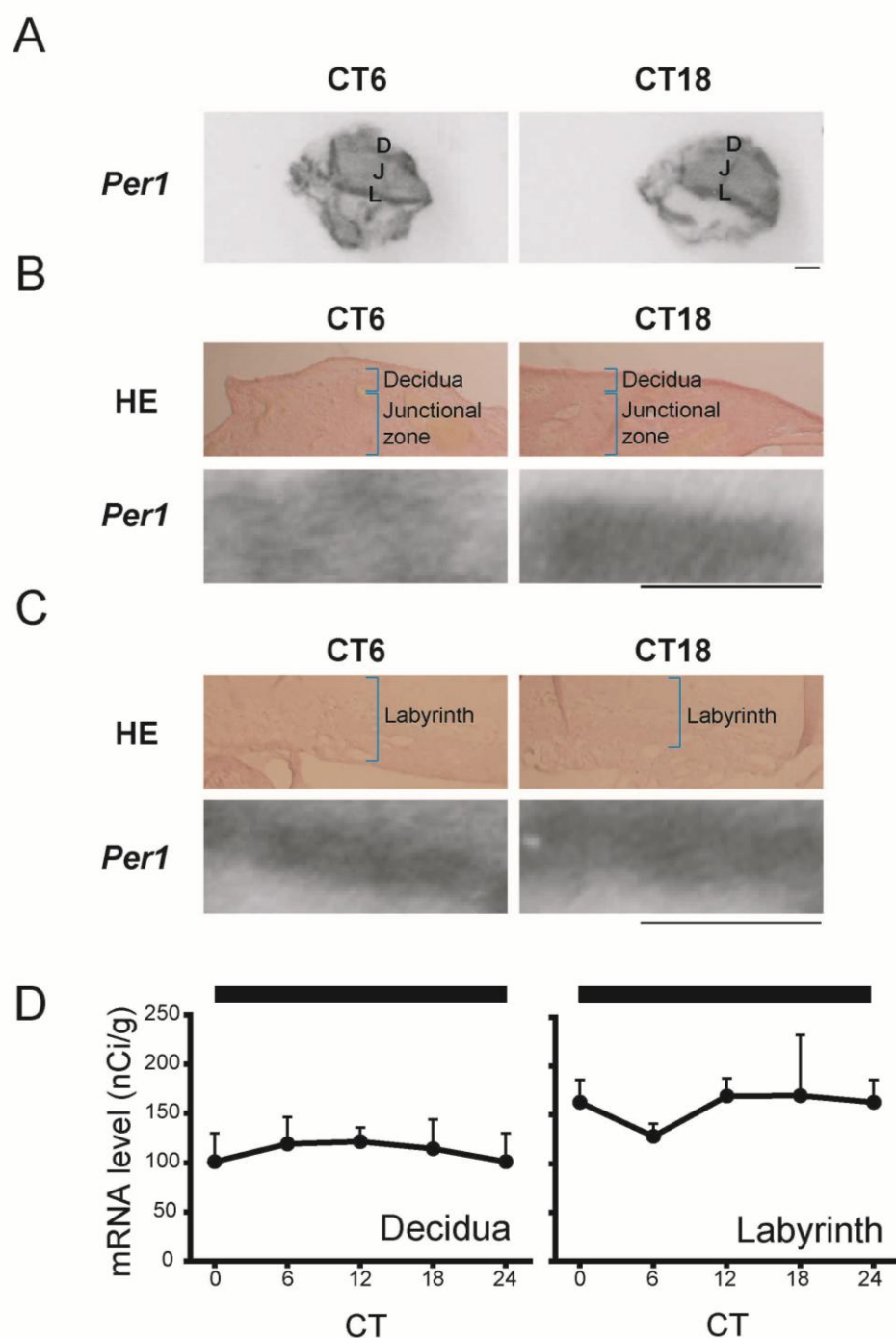


図 6. 恒暗環境下における胎生 12 日の野生型母ラットから取り出した脱落膜及び胎盤の *Per1* 遺伝子の mRNA の発現. (A) ラットは、生物時計に対する光環境の影響を取り除くため、組織の外植に先立ち 2 日間恒暗環境下においた. 提示されている *in situ hybridization* のフィルム画像は、胎生 12 日の Circadian time (CT) 6 と CT18 における、脱落膜及び胎盤の *Per1* mRNA 発現の変化を示している. CT0 と CT12 は各々明暗環境下における点灯と消灯の時間にほぼ一致する. CT0 は活動の終了時間とした(使用したラットは夜行性である). D, decidua; 脱落膜. J, junctional zone. L, labyrinth; 迷路部. The bar = 1mm. (B) *in situ hybridization* 後、HE 染色された脱落膜と junctional zone. The bar = 1mm. (C) *in situ hybridization* 後、HE 染色された迷路部. The bar = 1mm. (D) 脱落膜と迷路部における、*Per1* mRNA の発現量を 24 時間で示したグラフ (各々のサンプリング時間につき $n = 5$, mean \pm S.E.). グラフの上部にある黒の水平棒は、24 時間継続した暗期を表している. 脱落膜、迷路部ともに *Per1* mRNA の発現に概日リズムは観察されない (one-way ANOVA, $p > 0.05$).

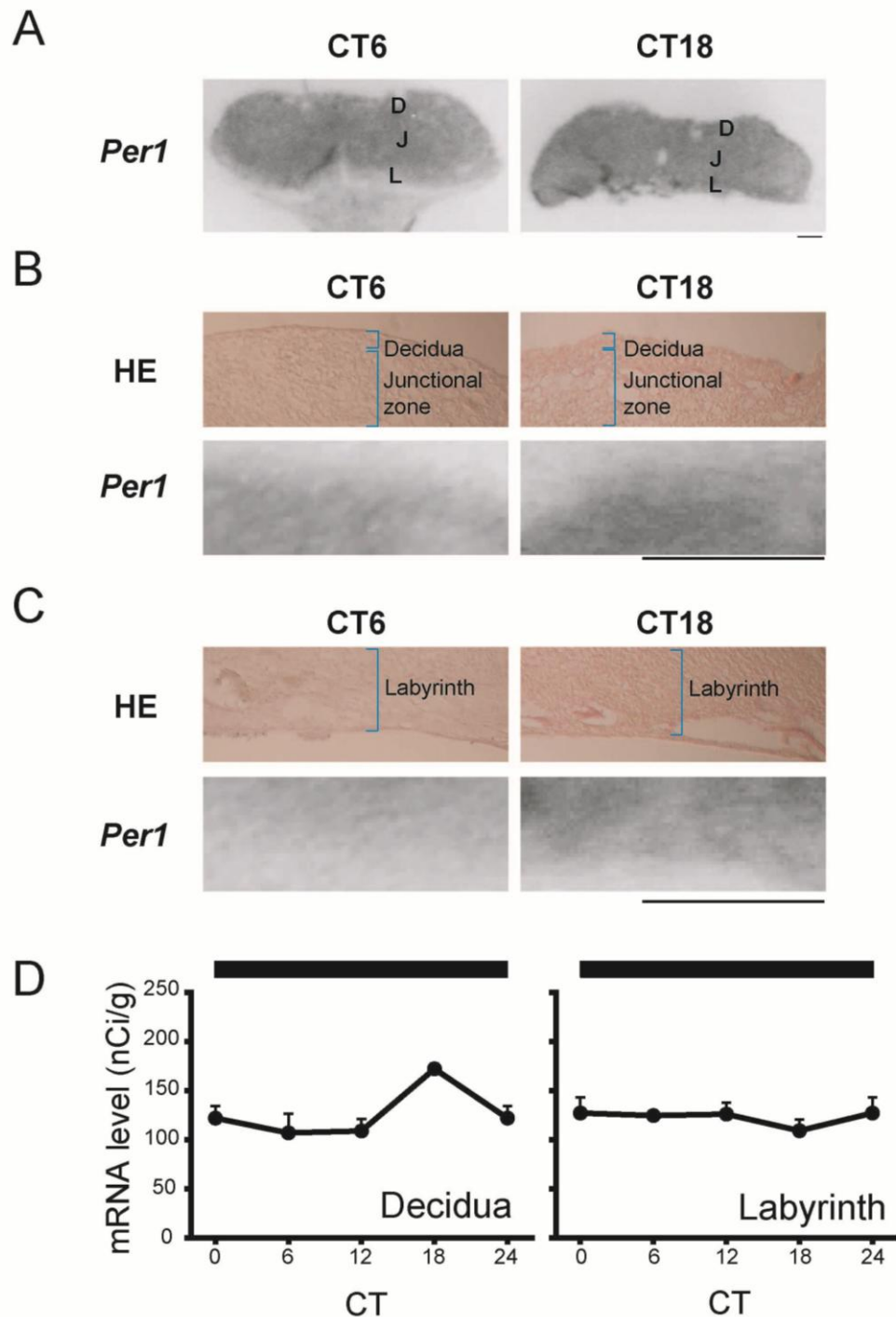


図 7. 恒暗環境下における胎生 22 日の野生型母ラットから取り出した脱落膜及び胎盤の *Per1* 遺伝子の mRNA の発現. (A) ラットは、生物時計に対する光環境の影響を取り除くため、組織の外植に先立ち 2 日間恒暗環境下においた. 提示されている *in situ hybridization* のフィルム画像は、胎生 22 日の CT6 と CT18 における、脱落膜及び胎盤の *Per1* mRNA 発現の変化を示している. D, decidua; 脱落膜. J, junctional zone. L, labyrinth; 迷路部. The bar = 1mm. (B) *in situ hybridization* 後、HE 染色された脱落膜と junctional zone. The bar = 1mm. (C) *in situ hybridization* 後、HE 染色された迷路部. The bar = 1mm. (D) 脱落膜と迷路部における、*Per1* mRNA の発現量を 24 時間で示したグラフ (各々のサンプリング時間につき $n = 5$, mean \pm S.E.). グラフの上部にある黒の水平棒は、24 時間継続した暗期を表している. 迷路部では *Per1* mRNA の発現に概日リズムが観察されない (one-way ANOVA, $p > 0.05$) 一方で、脱落膜では *Per1* mRNA の発現に概日リズムを認める (one-way ANOVA, $p < 0.05$).

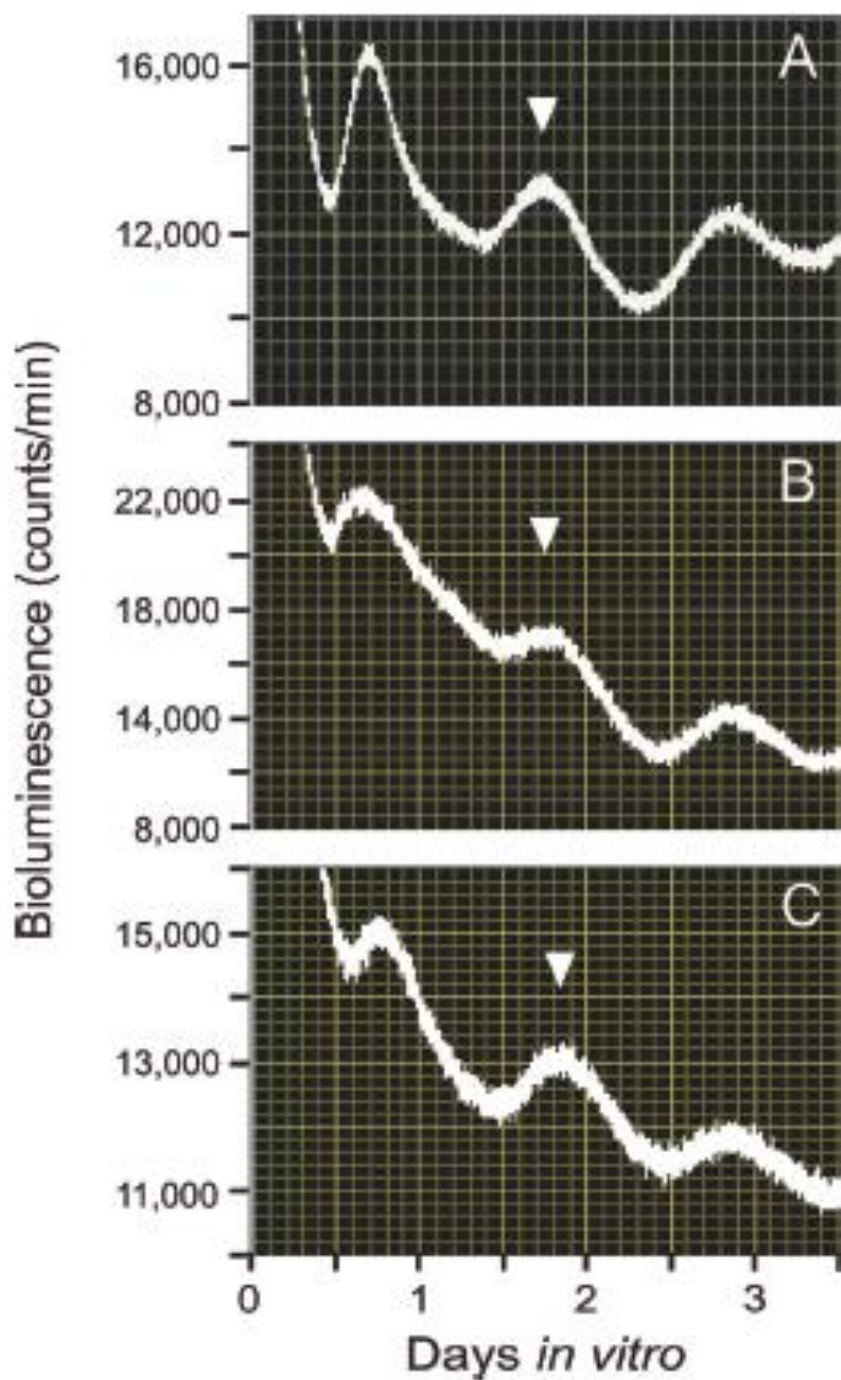


図 8. 明暗環境下における *Per1-luc* ラットから体外移植された母体視交叉上核組織からの *Per1-luc* 発光リズム. 12 : 12 時間の明暗環境で、餌は制約なく与えた *Per1-luc* ラットの非妊娠時 (A), 胎生 12 日 (B), 胎生 22 日 (C) における視交叉上核組織からの生データを示す. 統計上選んだピークを逆三角形で示している.

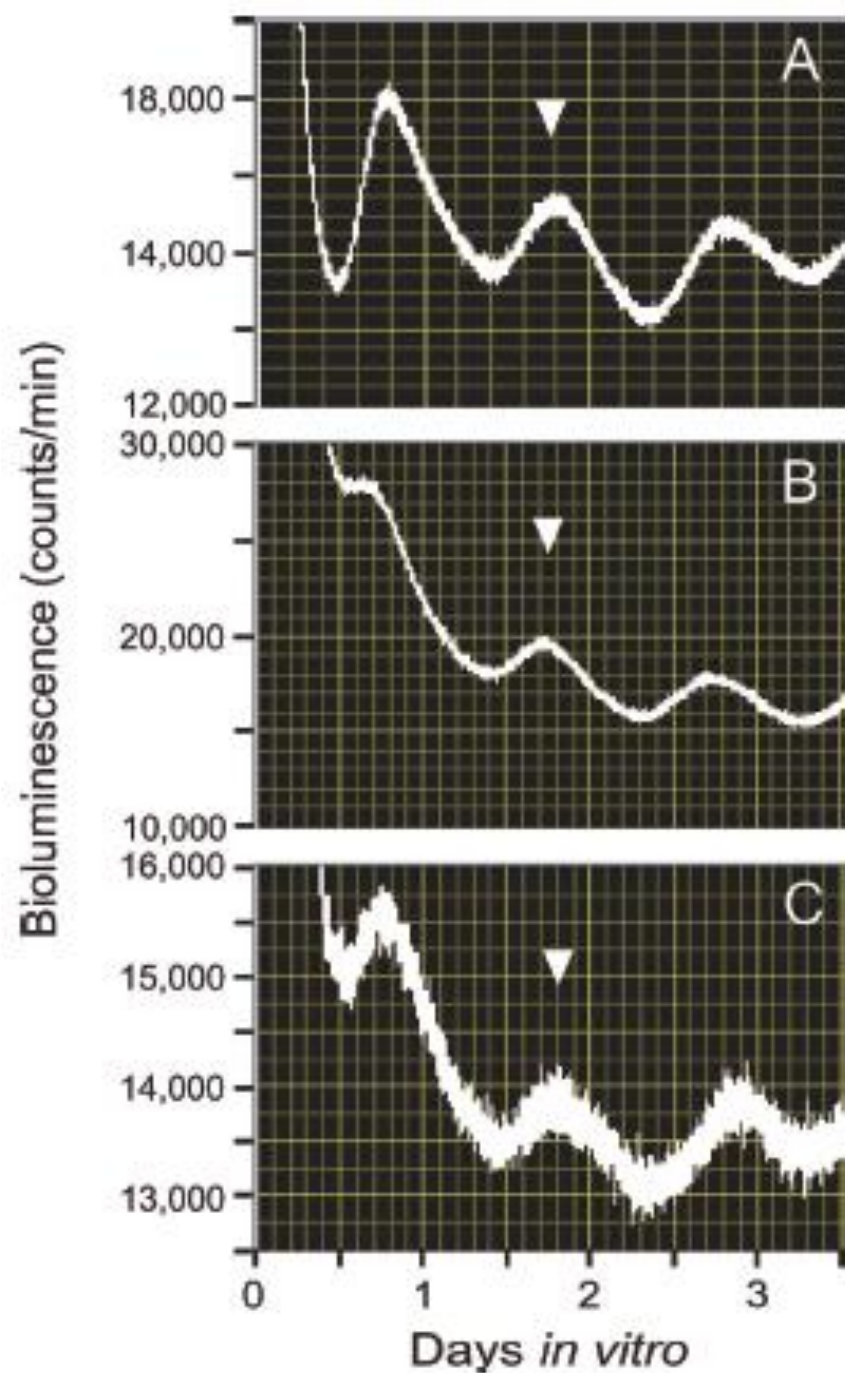


図 9. 恒暗環境下における *Per1-luc* ラットから体外移植された母体視交叉上核組織からの *Per1-luc* 発光リズム. ラットは, 生物時計への光環境の影響を取り除くため, 移植に先立ち恒暗環境下に 2 日間おいた. 恒暗環境下で, 餌は制約なく与えた *Per1-luc* ラットの非妊娠時 (A), 胎生 12 日 (B), 胎生 22 日 (C) における視交叉上核組織からの生データを示す. 統計上選んだピークを逆三角形で示している.

表 1. 明暗環境下と恒暗環境下における非妊娠，妊娠ラットの子宮と視交叉上核の Per1-luc 発現のピーク，周期および振幅.

			Peak (hrs <i>in vitro</i>)	Period (h)	Amplitude (photons/min)
LD	Uterus	Nonpregnant	47.1 ± 1.1	24.1 ± 0.8	16,663 ± 4,262
		E12	46.8 ± 1.1	24.1 ± 0.5	29,686 ± 14,961
		E22	46.3 ± 2.2	25.1 ± 0.7	19,722 ± 10,786
	SCN	Nonpregnant	43.4 ± 0.8	24.1 ± 0.9	1,722 ± 410
		E12	42.8 ± 1.1	24.4 ± 0.8	1,446 ± 962
		E22	43.8 ± 1.3	23.9 ± 0.8	1,412 ± 761
	Uterus	Nonpregnant	48.0 ± 1.8	24.7 ± 1.1	19,013 ± 11,303
		E12	46.6 ± 0.7	24.0 ± 1.0	12,934 ± 7,538
		E22	46.1 ± 1.5	24.2 ± 0.7	12,332 ± 9,063
DD	SCN	Nonpregnant	44.2 ± 0.9	24.1 ± 0.7	1,704 ± 773
		E12	44.4 ± 1.2	24.0 ± 0.7	1,692 ± 1,096
		E22	44.1 ± 1.0	23.7 ± 0.5	1,333 ± 1,013

in vitro における，明暗環境（LD ; light-dark cycle）と恒暗環境（DD ; constant darkness）下の非妊娠（*n* = 5），妊娠（胎生 12 日（E12）と胎生 22 日（E22）それぞれに *n* = 5）Per1-luc ラットの子宮と視交叉上核の Per1-luc 発現の概日リズムのピーク，周期および振幅（各々 *n* = 5, mean ± S.D.）. ピークは，先行研究^{9), 13)}より，*in vitro* における最初の日（移植後 1 から 2.5 日）のピークとした．one-way ANOVA では，子宮，視交叉上核ともに，ピークと周期において，LD と DD の間で明らかな違いはなかった（*p* > 0.05）.